

УДК 544.01:536.7:532.73

## КИНЕТИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ АНТИБИОТИКА ЛИНКОМИЦИНА ИЗ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ БИОПОЛИМЕРНЫХ МЕМБРАН МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

Севостьянов М.А., Насакина Е.О., Баикин А.С., Леонов А.В.,  
Сергиенко К.В., Каплан М.А., Конушкин С.В., Колмаков А.Г.

*Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук,  
Москва, e-mail: smakp@mail.ru*

Разработана технология получения биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности с необходимыми для медицинского применения свойствами. Создана технология включения в мембраны на основе хитозана высокой плотности антибиотика общего действия – линкомицина. Изучено влияние толщины мембраны и pH окружающего мембраны раствора на кинетику высвобождения антибиотика из мембран. Показано, что кинетика высвобождения линкомицина из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности зависит от технологии изготовления мембраны и условий экстракции. Сделан вывод, что биodeградируемые биополимерные мембраны, используемые в данном исследовании, по техническим параметрам пригодны для изготовления биodeградируемых биополимерных покрытий стентов и протезов с пролонгированным и контролируемым высвобождением лекарственных препаратов в окружающие ткани.

**Ключевые слова:** контролируемая доставка фармацевтических препаратов, биodeградируемые мембраны, хитозан, антибиотик, линкомицин

## THE KINETICS OF LINCOMYCIN RELEASE FROM BIOPOLYMER BIODEGRADABLE OF MEMBRANES BASED ON HIGH DENSITY CHITOSAN

Sevostyanov M.A., Nasakina E.O., Baikin A.S., Leonov A.V., Sergienko K.V.,  
Kaplan M.A., Konushkin S.V., Kolmakov A.G.

*A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences,  
Moscow, e-mail: smakp@mail.ru*

The technology of production of biodegradable biopolymer membranes based on high density chitosan required for medical use properties was create. Created technology inclusion of lincomycin to membrane based on high density chitosan. The influence of the thickness of the membrane and the ambient pH of the membrane solution on the kinetics of antibiotic release from membranes was studied. It is shown that the kinetics of active substance release from biodegradable biopolymer membranes based on high density chitosan depends on the manufacturing technology of the membrane and the extraction conditions. Concluded that the biodegradable polymeric membranes used in this study are suitable for coating of stents and prostheses sustained and controlled release of drugs into the surrounding tissue.

**Keywords:** antibiotic, biodegradable membranes, polylactic acid, lincomycin

Разработка и изучение систем контролируемой доставки фармацевтических препаратов на основе биodeградируемых полимерных мембран является одним из наиболее перспективных и быстро развивающихся направлений химической технологии [10]. В настоящее время выделяющие лекарственные вещества материалы в основном используются для покрытия хирургических имплантатов или как перевязочные материалы. Такие материалы, как правило, содержат:

- 1) матрицу в виде волокон или непрерывного полимера;
- 2) терапевтически активное вещество, размещенное в матрице;
- 3) вспомогательное вещество которое либо способствует связыванию терапевти-

чески активного вещества с матрицей, либо, наоборот, способствует его высвобождению.

Основное преимущество систем контролируемой доставки фармацевтических препаратов заключается в возможности длительного поддержания стационарного уровня фармацевтического препарата в тканях или биологических жидкостях в течение необходимого для терапии времени. Эффективность систем с контролируемой доставкой фармацевтических препаратов во многом определяется свойствами материалов, из которых изготовлена матрица, свойствами терапевтически активного вещества и свойствами вспомогательного вещества [7]. В целом системы контролируемой доставки фармацевтических препаратов кроме необходимых физико-химических

и механических свойств (высокая сорбционная способность, эластичность, газопроницаемость, стабильность и т.п.) должны быть атравматичными, биосовместимыми, биodeградируемыми. Перспективным материалом для получения систем с контролируемой доставкой фармацевтических препаратов является хитозан [9].

В настоящее время хитозан и его производные с успехом используются для доставки лекарств через нос, слизистые мембраны глаз, а также ротовую полость. Благодаря своей катионной природе, хитозан способен образовывать нерастворимые полиэлектролитные комплексы с анионными полимерами [2]. Эта способность используется

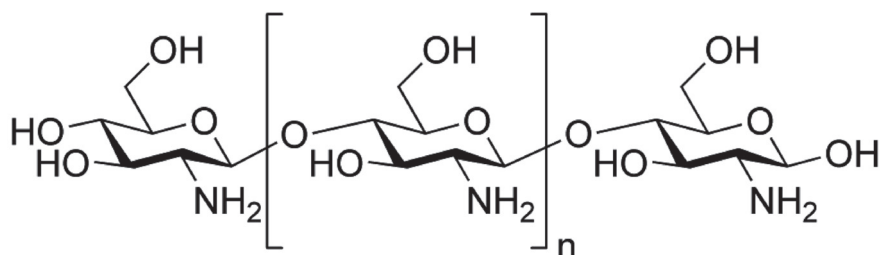


Рис. 1. Химическая формула хитозана

Хитозан – это полиаминосahарид, состоящий из случайно связанных  $\beta$ -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Получают хитозан только из хитина, в чистом виде он в природе не встречается [2]. Хитозан содержит в себе большое количество свободных аминогрупп, что позволяет ему связывать и прочно удерживать различные катионы [5]. Хитозан способен образовывать большое количество водородных связей, поэтому он может связать не только металлы, но и большое количество органических водорастворимых веществ [7]. Сам по себе хитозан плохо растворим в воде, так как в ней происходит протонирование аминогрупп, что затрудняет его растворение, при этом он довольно хорошо растворяется в неорганических кислотах [2]. В органических кислотах содержащих несколько карбоксильных групп, хитозан не растворяется, поскольку данные кислоты образуют межмолекулярные шивки [5]. Хитозан может удерживать в своей структуре как растворитель, так и растворенные в нём вещества [7]. В данной статье будет рассмотрено решение проблемы связанной с наличием кислоты в составе хитозана. Кроме того, хитозан может частично связывать жирорастворимые соединения за счет эффекта молекулярного сита и гидрофобных взаимодействий [9]. Для хитозана характерны мукоадгезивные свойства, то есть способность к прилипанию к слизистым оболочкам. Данные свойства хитозана активно используются при создании лекарственных форм, поступающих в организм через слизистые оболочки.

в технологиях капсулирования, в том числе при направленной радионуклидной терапии [1]. Нужно отметить, что при растворении в организме млекопитающих хитозан кроме описанных выше эффектов оказывает гипохолестеринемическое и дезинтоксикационное действие. Хитозан уменьшает уровень мочевой кислоты, холестерина и глюкозы в крови на фоне сахарного диабета, увеличивает эффективность усвоения кальция из пищи, обладает противогрибковыми и антибактериальными свойствами. На физиологическом уровне хитозан способствует усилению перистальтики кишечника, предотвращению всасывания жиров в тонком кишечнике, нормализации кишечной микрофлоры, более быстрому наступлению ощущения сытости после принятия пищи. За счет того, что хитозан обладает рядом уникальных свойств, его применяют в различных отраслях, например в сельском хозяйстве в качестве добавки в корма для животных, при изготовлении продуктов питания и косметики, а с недавнего времени и при создании продуктов биомедицины [5]. Нами создан ряд технологических решений получения биodeградируемых полимерных мембран и покрытий на основе хитозана высокой плотности с нужными механическими свойствами, однако принципиальная возможность создания на их основе систем контролируемой доставки фармацевтических препаратов до сих пор не подтверждена. Цель данной работы заключалась в исследовании кинетики высвобождения фармацевтического препарата линкомицина (антибиотик группы линкозамидов)

(рис. 2) из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности. Принципиальная новизна представленной работы заключается в создании и исследовании биodeградируемой полимерной мембраны на основе хитозана высокой плотности, обладающей необходимыми механическими свойствами и способными без остатка высвободить фармацевтический препарат линкомицин во временном интервале от 1 суток до 1 месяца.

Мембраны на основе хитозана получали методом литья раствора полимера с последующим испарением растворителя. Приготовление 3%-ных растворов высокомолекулярного хитозана (1000 кДа) (Sigma-Aldrich, США,) в 3%-ном растворе соляной кислоты (Иреа 2000, Россия) проводили перемешиванием до гомогенного состояния в течение 1,5 ч при температуре раствора 40°C. Для депонирования в мембрану лекарственного препарата в однородный

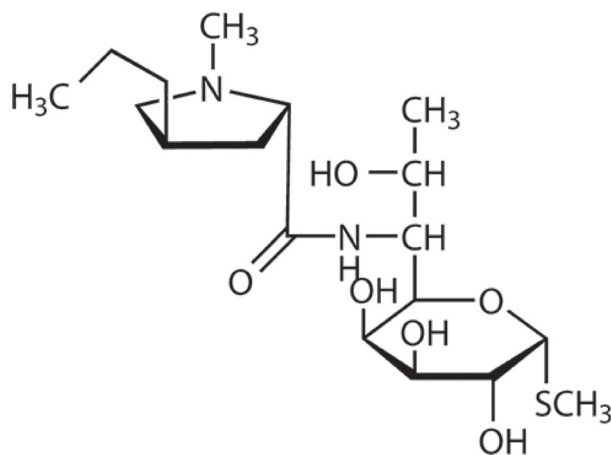


Рис. 2. Химическая формула линкомицина

Уникальные свойства хитозана, а именно биосовместимость с тканями организма млекопитающих, бактериостатичность, способность усиливать регенерационные процессы, а также способность к пленкообразованию, определяют возможность использования хитозана в качестве покрытий хирургических имплантов. Нанесение его на поверхности имплантов способствует уменьшению вероятности послеоперационных осложнений. Одним из существенных преимуществ покрытий имплантов пленками на основе хитозана является их способность к ферментативному разложению. Такие биodeградируемые полимерные покрытия с лекарственными препаратами постепенно разрушаются в организме, при этом скорость высвобождения лекарственного препарата пропорциональна скорости биodeградации матрицы. В настоящее время известны несколько технологий получения биodeградируемых полимерных мембран и покрытий на основе хитозана высокой плотности с нужными свойствами [4, 6], однако даже основные закономерности высвобождения из них лекарственных препаратов до сих пор не изучены.

раствор добавляли порошок антибиотика широкого спектра действия линкомицин гидрохлорид (Акрихин ХФК, Россия). Полученный раствор разливали в пластиковые формы размером 50×30 мм и заливали фиксирующим раствором (30% этиловый спирт и 70% аммиачная вода) на 20 минут. Водородный показатель раствора измеряли с помощью рН-метр Эксперт-001 (Эконикс, Россия). По истечении этого времени фиксирующий раствор сливали и сушили пленки при 37°C в течение 24 часов. Сухие пленки отмывали в фиксирующем растворе (50 мл на одну пленку) в течение 5 часов при комнатной температуре с последующей промывкой в дистиллированной воде, а затем в этиловом спирте. После отмывки пленки опять сушили при 37°C в течение 24 часов. В итоге получают пластичные мембраны содержащие линкомицин и имеющие толщину от 200 до 400 мкм.

Непосредственно перед экспериментом мембраны помещали в водные растворы для экстракции с разными значениями рН. Изучение кинетики высвобождения линкомицина из мембран на основе хитозана высокой плотности в раствор для экстракции проводили методом дифференциальной

спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой части спектра [9]. Измерения проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при помощи спектрофотометра Cary 100 (Varian, Австралия) [3]. Суть метода заключается в сравнении спектральных свойств двух растворов, отличающихся по одному признаку. В нашем случае проводили сравнение раствора, образующегося над хитозановой мембраной с антибиотиком, и раствора над хитозановой мембраной без антибиотика. Данный подход позволяет учесть влияние хитозана, который хоть и плохо, но также частично растворяется в водных растворах. Для контроля растворения хитозана высокой плотности использовали сравнение раствора, образующегося над хитозановой мембраной, не содержащей антибиотик, и изначального раствора, в котором проходила экстракция веществ из мембран [9]. Для моменталь-

ных количественных оценок высвобождения антибиотика из мембран на основе хитозана высокой плотности было необходимо определить коэффициенты молярного поглощения линкомицина (рис. 3), мы приняли его за 8300 л/моль при 192 нм.

Исследовано влияние pH на высвобождение линкомицина из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности. В большинстве исследованных нами случаев скорость высвобождения линкомицина из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности зависит от значений pH (табл. 1, 2). Общей является следующая закономерность: чем ниже значение pH, тем быстрее идет высвобождение антибиотика. Так, для фильтра толщиной 200 мкм при pH 5,8 и при pH 9,0 динамика выхода линкомицина к 7 суткам отличается почти в 2 раза, для фильтра толщиной 400 мкм отличие – 1,5 раза. Необходимо

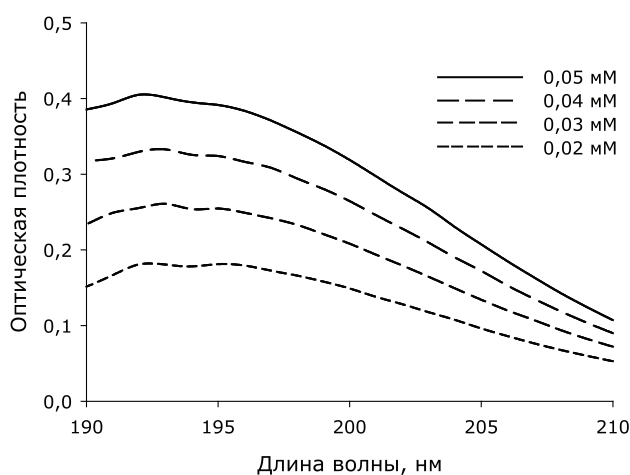


Рис. 3. Спектральные свойства растворов линкомицина в концентрациях (0,02–0,05 мМ) в фосфатно-солевом буфере (1 мМ; pH 7,4)

Таблица 1

Высвобождение линкомицина (0,9 мас %) из 200 мкм биodeградируемой биополимерной мембраны, созданной на основе хитозана высокой плотности, при разных значениях pH экстрагирующего водного раствора

Время, сутки	Экстракция линкомицина, %			
	pH 5,8	pH 6,3	pH 7,4	pH 8,5
1	11,3 ± 0,9	13,3 ± 1,0	11,0 ± 1,0	11,2 ± 0,8
2	13,3 ± 1,1	17,1 ± 1,6	14,6 ± 1,2	11,2 ± 0,9
3	33,8 ± 2,1	41,4 ± 3,7	37,6 ± 2,4	25,0 ± 2,0
5	44,4 ± 3,6	50,8 ± 4,9	40,2 ± 3,1	27,6 ± 2,2
7	59,1 ± 3,9	57,1 ± 5,1	49,8 ± 4,5	29,5 ± 2,4
10	75,5 ± 3,8	66,1 ± 5,2	50,8 ± 4,0	34,8 ± 2,9
13	88,6 ± 4,2	80,2 ± 5,3	57,9 ± 4,3	35,7 ± 2,9
15	93,1 ± 1,9	83,7 ± 6,4	58,1 ± 4,4	35,7 ± 3,0
30	99,1 ± 0,3	93,8 ± 2,4	60,1 ± 4,5	36,8 ± 3,0

отметить, что количество высвободившегося антибиотика за первые сутки в значительной мере не зависит от значений pH, это связано в первую очередь с краевыми эффектами, когда выход линкомицина в раствор не связан с растворением или разбуханием хитозана.

Исследовано влияние толщины биодеградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности на высвобождение из них линкомицина. При кислых pH 5,8 со вторых по тринадцатые сутки экстракции наблюдается следующая закономерность – чем толще мембрана, тем быстрее идет высвобождение. Так при pH 5,8 за двое суток из 200 мкм мембраны в раствор выходит линкомицина около 13%, из из 400 мкм – 18%, на пятые 44% против 61% и т.д. При более длительных временах экспонирования различие в скоростях экс-

тракции исчезает, система приходит в состояние насыщения. При показателях pH от 6,3 до 8,5 не наблюдалось существенных различий в скорости экстракции линкомицина из мембран 200 и 400 мкм.

В целом кинетика выхода линкомицина из биодеградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности толщиной 200 и 400 мкм адекватно описывается экспоненциальным уравнением (Rise to Maximum) типа  $y = a(1 - e^{-bx})$ . Нужно отметить, что данный тип уравнения при подгонке имеет корреляцию с реальными результатами не менее  $R^2 = 0,96$ . Например, для формального описания кинетики выхода линкомицина из биодеградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокого давления толщиной 400 мкм при pH 5,8 параметр  $a = 100,43$ ,  $b = 0,14$ , при этом  $R^2 = 0,99$ .

Таблица 2

Высвобождение линкомицина (0,9 мас %) из 400 мкм биодеградируемой биополимерной мембраны, созданной на основе хитозана высокой плотности, при разных значениях pH экстрагирующего водного раствора

Время, сутки	Экстракция линкомицина, %			
	pH 5,8	pH 6,3	pH 7,4	pH 8,5
1	9,8 ± 0,7	7,2 ± 0,5	6,3 ± 0,5	5,7 ± 0,5
2	18,7 ± 1,2	15,0 ± 0,9	10,3 ± 0,7	11,7 ± 0,5
3	48,9 ± 2,9	40,9 ± 2,8	29,3 ± 1,3	26,9 ± 0,5
5	60,8 ± 3,6	55,1 ± 3,2	50,2 ± 2,9	40,2 ± 0,5
7	72,1 ± 4,2	69,6 ± 3,9	60,7 ± 3,4	47,6 ± 0,5
10	80,2 ± 4,0	75,5 ± 3,9	67,3 ± 3,0	50,9 ± 0,5
13	89,6 ± 2,9	83,6 ± 3,7	68,0 ± 3,0	52,0 ± 0,5
15	95,0 ± 1,2	86,6 ± 3,7	68,3 ± 3,1	54,0 ± 0,5
30	99,0 ± 0,2	89,6 ± 3,8	69,1 ± 3,1	56,9 ± 0,5

Таблица 3

Высвобождение линкомицина (1,8 мас %) из 200 мкм биодеградируемой биополимерной мембраны, созданной на основе хитозана высокой плотности, при разных значениях pH экстрагирующего водного раствора

Время, сутки	Экстракция линкомицина, %			
	pH 5,8	pH 6,3	pH 7,4	pH 8,5
1	7,1 ± 0,6	6,1 ± 0,4	5,8 ± 0,2	4,7 ± 0,3
2	18,9 ± 1,1	12,1 ± 0,9	9,7 ± 0,7	10,6 ± 1,3
3	36,3 ± 1,9	33,5 ± 2,0	22,1 ± 1,7	24,5 ± 1,8
5	56,8 ± 3,7	45,6 ± 3,5	39,9 ± 2,7	30,6 ± 2,6
7	66,7 ± 4,2	57,0 ± 3,9	55,0 ± 3,9	34,5 ± 3,3
10	78,4 ± 4,9	65,8 ± 4,7	56,6 ± 4,3	38,6 ± 3,2
13	89,9 ± 3,0	76,2 ± 4,2	57,6 ± 4,3	39,2 ± 3,8
15	93,9 ± 1,8	79,3 ± 3,9	57,7 ± 4,4	40,0 ± 3,6
30	99,9 ± 0,1	82,3 ± 4,1	59,3 ± 4,4	40,1 ± 3,6

Исследовано влияние концентрации линкомицина на его высвобождение из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности (табл. 1, 3). Показано, что изменение концентрации линкомицина в два раза, от 0,9 до 1,8%, не оказывает существенного влияния на скорость его высвобождения.

Таким образом, в работе показано, что динамика высвобождения фармацевтического препарата линкомицина из биodeградируемых биополимерных мембран на основе хитозана высокой плотности слабо зависит от толщины мембран и концентрации антибиотика. Биodeградируемые биополимерные мембраны используемые в данном исследовании по техническим параметрам вполне пригодны для изготовления покрытий стентов и протезов с пролонгированным и контролируемым высвобождением лекарственных препаратов в окружающие ткани [8].

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ «14-29-10208-офи\_м» и гранта РФФИ «16-08-01132-А».*

#### Список литературы

1. Воденев В.А., Звягин А.В., Шилягина Н.Ю., Куликов Д.А., Куликов А.В., Гудков С.В. Направленная радионуклидная терапия: Современное состояние и перспективы // Гены и клетки. – 2015. – Т. X, № 1. – С. 23–29.
2. Гальбрайт Л.Г. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 1. – С. 51–56.
3. Иванов В.Е., Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих форм белков сыворотки крови под действием тепла // Альманах клинической медицины. – 2014. – Т. 31. – С. 17–20.
4. Севостьянов М.А., Федотов А.Ю., Колмаков А.Г., Заболотный В.Т., Баринов С.М., Гончаренко Б.А., Комлев В.С., Баикин А.С., Сергиенко К.В., Тетерина А.Ю., Насакина Е.О., Леонова Ю.О., Леонов А.В. Механические свойства композиционного материала «наноструктурный нитинол – хитозан» // Материаловедение. – 2014. – № 3. – С. 34–37.
5. Скрыбин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение – М.: Наука, 2002. – 386 с.
6. Федотов А.Ю., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г., Сергиенко К.В., Тетерина А.Ю., Цванг Ф.М., Егоров А.А. Пенки на основе хитозана с лекарственными препаратами // Материаловедение, 2014. – № 2. – С. 15–18.
7. Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S.M., Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications // Res. Pharm. Sci. – 2015. – Vol. 10 (1). – P. 1–16.
8. Nasakina E.O., Baikin A.S., Sergienko K.V., Sevost'yanov M.A., Kolmakov A.G., Goncharenko B.A., Zabolotnyi V.T., Fadeev R.S., Fadeeva I.S., Gudkov S.V., Solntsev K.A. Biocompatibility of nanostructured nitinol with titanium or tantalum surface composite layers formed by magnetron sputtering // Doklady Chemistry. – 2015. – Vol. 461 (1). – P. 86–88.
9. Sevost'yanov M.A., Fedotov A.Yu., Nasakina E.O., Teterina A.Yu., Baikin A.S., Sergienko K.V., Kolmakov A.G., Komlev V.S., Ivanov V.E., Karp O.E., Gudkov S.V., Barinov S.M. Kinetics of the release of antibiotics from chitosan-based biodegradable biopolymer membranes // Doklady Chemistry. – Vol. 465 (1). – P. 278–280.
10. Zia K.M., Noreen A., Zuber M., Tabasum S., Mujahid M. Recent developments and future prospects on bio-based polyesters derived from renewable resources: A review // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – Vol. 82. – P. 1028–1040.